

RIMENA DE MELO GERMANO DA SILVA

**Comparação do comprimento do úmero em fetos portadores
de Síndrome de Down com o comprimento
do úmero em fetos normais**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Programa de Obstetrícia e Ginecologia

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Zugaib

**São Paulo
2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Rimena de Melo Germano da

Comparação do comprimento do úmero em fetos portadores de síndrome de Down com o comprimento do úmero em fetos normais / Rimena de Melo Germano da Silva. -- São Paulo, 2013.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Obstetrícia e Ginecologia.

Orientador: Marcelo Zugaib.

Descritores: 1.Úmero/ultrassonografia 2.Síndrome de Down/ultrassonografia 3.Ultrassonografia pré-natal 4.Programas de rastreamento 5.Estudos de casos e controles 6.Sensibilidade e especificidade 7.Úmero/embriologia

USP/FM/DBD-402/13

A **Deus**, que é o início de todas as coisas e detentor de todo o saber que nos cerca, por mais essa graça alcançada.

Aos meus queridos pais, **Maria Antonia e Walter**, que me ensinaram que o maior legado que podem deixar para seus filhos é a educação e sempre me incentivaram nas minhas jornadas, torcendo nas conquistas e amparando nos momentos difíceis.

Ao meu amor, **Glauber**, meu grande companheiro de todas as horas, que algumas vezes adiou a realização de seus sonhos para que eu concretizasse os meus, pelo seu apoio incondicional, pela paciência, pela parceria e pelo seu amor.

À nossa filha, **Laís**, que ainda no ventre é tão desejada, esperada e amada, por me encorajar ainda mais a alcançar meus objetivos.

Aos meus irmãos, **Rodrigo e Marcela**, pela amizade e pelo incentivo, e pela família que somos.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Marcelo Zugaib, digníssimo Professor Titular de Obstetrícia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, por abrir as portas desse serviço seletivo e pelo privilégio de contar com sua orientação nesta dissertação.

Ao Prof. Dr. Victor Bunduki, Idealizador e responsável inicial pela realização deste projeto. Agradeço por me incentivar e acreditar em meu potencial. Minha admiração e gratidão por todos os ensinamentos, pela amizade e pelas portas abertas para a vida profissional.

À Profa. Dra. Rossana Pulcineli V. Francisco, pelo carinho e ajuda fundamental na conclusão desta dissertação, e pela colaboração na fase de qualificação.

À Profa. Dra. Maria de Lourdes Brizot e ao Dr. Edécio Armbruster de Moraes, pela atenção dispensada na qualificação e pelas valiosas contribuições à conclusão deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marco Antônio Borges Lopes, pelo carinho e pela paciência em seus ensinamentos, os quais contribuíram sobremaneira para minha formação em medicina fetal.

Ao Dr. Javier Miguelez, pela imensa contribuição na elaboração desta dissertação e por dividir seus conhecimentos.

Aos colegas Gustavo de Paula Pereira, Rogério Caixeta, Carolina Vilas Boas, Ana Paula Dias Alves, Lorena Caldas, Julianny Carneiro Nery, Helenice Juliano Kang, Rita Alan Machado, Thais Borghi, Vanessa Vigna Goulart, Marcela Xavier, Renata Dourado, Marcela Stievani, Maria Izabel Boyaciyani, Carolina Fiori, Daniela Melara, Bruna Barbosa, Karen Hettfleisch, Tatiana Liao, e tantos outros queridos amigos que fiz no HCFMUSP, minha gratidão pela amizade, pelos momentos de descontração e pelo incentivo nos momentos difíceis.

Ao amigo Amadeu Santos, sempre atencioso, carinhoso, e pronto a auxiliar e a facilitar a luta diária no ambulatório.

Às Sras. Adriana Regina Festa, Soraia Silva, Miriam Souto, Raquel Costa, Célia Nunes, Fátima Abdul, Lia Regis e aos Srs. Alan Garcia e William Santos, pelo respeito e pela prontidão em ajudar.

Aos demais professores, assistentes, colegas e funcionários da Clínica Obstétrica da FMUSP, que sempre me apoiaram, respeitaram e contribuíram para a minha formação profissional.

À minha família, sem vocês eu nunca teria conseguido.

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE GRÁFICOS

RESUMO

SUMMARY

1 INTRODUÇÃO	2
2 OBJETIVOS	6
2.1 Objetivos primários	6
2.2 Objetivo secundário	6
3 REVISÃO DA LITERATURA	8
4 CASUÍSTICA E MÉTODO	15
4.1 Tipo de estudo	15
4.2 Local do estudo.....	15
4.3 Coleta de dados.....	15
4.4 Seleção de pacientes.....	16
4.4.1 Grupo dos casos com síndrome de Down	16
4.4.2 Grupo dos controles normais	16
4.5 Critérios de Inclusão	17
4.5.1 Casos.....	17
4.5.2 Controles.....	17
4.6 Variáveis analisadas	18
4.7 Datação da gestação	18
4.8 Equipamentos de ultrassonografia utilizados.....	18
4.9 Técnica de medida do úmero.....	19
4.10 Análise estatística dos dados.....	19
4.10.1 Análise do comprimento do úmero	20
4.10.1.1 <i>Grupo controle</i>	20
4.10.1.2 <i>Comparação dos casos de T21 com o grupo controle</i>	20
4.11 Aspectos éticos.....	22

5 RESULTADOS	24
5.1 Caracterização da população	24
5.1.1 Casos.....	24
5.1.2 Controles.....	24
5.2 Exames ultrassonográficos	25
5.2.1 Casos.....	25
5.2.2 Controles.....	25
5.2.3 Análise dos dados controlando-se a idade materna	27
5.2.4 Análise comparativa entre o comprimento do útero esperado segundo equação de Jeanty e curva da população local e o observado em fetos com T21.....	28
6 DISCUSSÃO	31
7 CONCLUSÃO	39
8 ANEXO	41
ANEXO A – Aprovação do projeto de pesquisa.....	41
9 REFERÊNCIAS	43

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACOG	<i>American College of Obstetricians and Gynecologists</i>
CAPPesq	Comitê de Ética em Pesquisa
CCN	Comprimento Cabeça-Nádegas
DBP	Diâmetro Biparietal
DFCSM	DNA Fetal Circulante no Sangue Materno
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DP	Desvio-Padrão
DUM	Data da Última Menstruação
FMF	<i>Fetal Medicine Foundation</i>
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
MoMs	Múltiplos da Mediana
RV	Razão de Verossimilhança
T21	Trissomia do Cromossomo 21

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Descrição dos resultados dos grupos controle e casos26
Tabela 2	Descrição da idade gestacional, idade materna e MoMs dos fetos com T21 e fetos normais selecionados e resultado dos testes comparativos28

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** Valores médios dos úmeros (MoMs) considerando a equação de normalidade para fetos da população local e respectivos erros padrões segundo grupos e resultado do teste.....26
- Gráfico 2** Curvas de normalidade do úmero segundo idade gestacional e valores dos fetos com T21.....29

RESUMO

Silva RMG. Comparação do comprimento do úmero em fetos portadores de síndrome de Down com o comprimento do úmero em fetos normais. [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2013.

Objetivo: Comparar o comprimento do úmero em fetos portadores de síndrome de Down (T21) com o comprimento do úmero em fetos normais, utilizando instrumentos de referência da população local. **Método:** Estudo caso-controle retrospectivo que comparou o comprimento do úmero de fetos normais com os fetos com T21, entre 18 semanas e 23 semanas e 6 dias. Os exames dos fetos com T21 foram realizados entre 1994 e 2012. Os controles normais foram avaliados entre 2007 e 2009. Foram analisadas as médias, medianas e desvios-padrão da idade materna, idade gestacional e medida do úmero. Posteriormente, foi feita análise da correlação entre as medidas dos úmeros e a idade gestacional, sendo seus valores expressos em múltiplos da mediana (MoMs). O comprimento do úmero dos fetos com T21 foram confrontados com os fetos normais utilizando o teste t-Student. A medida do úmero foi avaliada considerando-se os níveis de corte abaixo do percentil 10, 5 e 2,5 a fim de obter as respectivas taxas de sensibilidade. Calculou-se, ainda, a razão de verossimilhança (RV). A seguir, foi utilizado um modelo linear geral tendo a idade materna como covariável para controlar na comparação. Comparou-se, também, a medida do comprimento do úmero dos fetos normais da população local com o comprimento do úmero esperado baseado na curva de Jeanty. Os testes foram realizados com nível de significância de 5%. **Resultados:** Foram incluídos 58 casos com T21 e 1888 controles normais. A sensibilidade do comprimento do úmero para a detecção da T21 utilizando o nível de corte abaixo do percentil 10 foi de 44,8 % com RV de 4,4, abaixo do percentil 5 foi de 34,4 % com RV de 6,9 e abaixo do percentil 2,5 foi de 31,0 % com RV de 12. O valor médio dos úmeros, em MoMs, de fetos com T21 é estatisticamente inferior ao dos fetos normais ($p < 0,001$), utilizando o teste t-Student. Quando controlada a idade materna na comparação entre os grupos, a diferença permaneceu estatisticamente significativa ($p < 0,001$). Fez-se uma análise para comparar o comprimento do úmero nos fetos normais da população local com o comprimento do úmero esperado para a curva de Jeanty, e viu-se que os fetos normais locais têm comprimento do úmero estatisticamente significativo menor. **Conclusões:** Existe diferença estatisticamente significativa entre o comprimento do úmero de fetos normais e de fetos com T21 na população local ($p < 0,001$). A sensibilidade para detecção de T21 foi de 44,8%, 34,4% e 31%, para o úmero abaixo do percentil 10, 5 e 2,5, respectivamente. A curva de Jeanty não tem rendimento adequado para uso como controle do

crescimento umeral em fetos normais locais, acarretando com seu uso o inevitável aumento da taxa de falsos positivos de úmeros curtos.

Descritores: Úmero/ultrassonografia; Síndrome de Down/ultrassonografia; Ultrassonografia pré-natal; Programas de rastreamento; Estudos de casos e controles; Sensibilidade e especificidade; Úmero/embriologia.

SUMMARY

Silva RMG. Comparison of humeral length between fetuses with Down syndrome and normal fetuses [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2013.

Objective: This study aimed to compare the humeral length (HL) in fetuses with Down syndrome (T21) with HL in normal fetuses, by using instruments of reference of the local population. **Method:** A case-control study was conducted comparing HL in normal fetuses with HL in fetuses with T21, aged between 18 weeks and 23 weeks and 6 days. Fetuses with T21 who were examined between 1994 and 2012 were included. The normal controls were evaluated between 2007 and 2009. The averages, medians, and standard deviations were obtained for maternal age, gestational age, and HL. Afterwards, we analyzed the correlation between the HL and the gestational age, with values expressed as multiples of the median (MoMs). The HLs of fetuses with T21 were compared with the HLs in normal fetuses by using Student's *t*-test. The humeri were evaluated considering the cut-off levels below the 10th, 5th, and 2,5th percentiles to obtain the sensitivity. The likelihood ratios (LR) were also calculated. Next, a general linear model was used with maternal age as a covariate to control for comparison of the groups. Comparison was also made between the HL of fetuses in the local population and the expected HL, based on the Jeanty curve. The tests were performed with a significance level of 5%. **Results:** The study included 58 cases with T21 and 1888 normal controls. The sensitivity of the HL to detect T21 by using a cut-off level below the 10th percentile was 44.8% with a LR of 4.4; below the 5th percentile, the sensitivity was 34.4% with a LR of 6.9; and below the 2.5th percentile, the sensitivity was 31.0% with a LR of 12. The average value of the humerus, in MoMs, of fetuses with T21 is statistically lower than that of normal fetuses ($p < 0.001$), as measured by using Student's *t*-test. When maternal age was controlled as a covariant in the comparison between groups, the difference remained statistically significant ($p < 0.001$). An analysis to compare the HL in normal fetuses of the local population with expected HL based on the Jeanty curve concluded that the HL in normal fetuses of the local population is lower than expected. **Conclusions:** There is a statistically significant difference between the HL of normal fetuses and HL of fetuses with T21 in the local population ($p < 0.001$). The sensitivity for detection of T21 was 44.8%, 34.4%, and 31% for the humerus below the 10th, 5th and 2.5th percentile, respectively. The Jeanty curve is not adequate to use as growth control for humeri in local normal fetuses, as its use leads to an increase in false positive rates when measuring the proportion of short humeri.

Descriptors: Humerus/ultrasonography; Down syndrome/ultrasonography; Ultrasonography, prenatal; Mass screening; Case-control studies; Sensitivity and specificity; Humerus/embryology.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A Síndrome de Down ou trissomia do cromossomo 21 (T21) é um distúrbio causado pela presença de um cromossomo 21 extranumerário, decorrente da não disjunção cromossômica durante a gametogênese¹. É a alteração cromossômica mais frequente entre os nascidos vivos, com prevalência de 1/500 a 1/1000 em países desenvolvidos². A chance para que uma mulher tenha um filho com T21 varia de acordo com a sua faixa etária, sendo que aos 20 anos é de 1/1200 nascidos vivos, enquanto em que aos 40 anos eleva-se para 1/50 nascidos vivos³. Considerando-se os exames de cariótipo fetal, a T21 é responsável por cerca de 50% das cromossomopatias nos humanos¹.

A T21 tem alta taxa de morbidade e mortalidade considerável, sendo que o comprometimento cognitivo está presente em praticamente todos os casos em graus variados. As crianças portadoras desta síndrome têm alto risco de apresentarem alterações morfológicas, incluindo malformação cardíaca, anormalidades gastrointestinais e craniofaciais, além de uma maior prevalência de leucemia e Doença de Alzheimer^{1,4}.

Os métodos diagnósticos pré-natais da T21 incluem os métodos clássicos (invasivos), que são: a biópsia de vilo corial, a amniocentese, e a cordocentese^{5,6}, além do novo método não invasivo por meio da pesquisa de ácido desoxirribonucléico (DNA) fetal circulante no sangue materno⁷. Os métodos invasivos trazem um risco de perda fetal de 0,5 a 1%^{5,6}

Inicialmente, o diagnóstico pré-natal foi indicado em casos de risco aumentado para T21 fetal, como idade materna avançada, casal com antecedente de Síndrome de Down na prole ou um dos cônjuges portador de translocação cromossômica equilibrada⁸. Entretanto, notou-se que o número de T21 detectadas no período pré-natal continuava baixo, cerca de 30%^{3,9}. Isso deveu-se ao fato de que a maior parte das trissomias ocorre em mães jovens, sem antecedentes e sem indicação para os métodos diagnósticos³.

Atualmente, utilizamos os testes de rastreamento ultrassonográficos para a detecção dos fetos com maior risco para a T21, superando, em muitos centros, a indicação do método diagnóstico somente por idade materna avançada. A eficácia destes testes de rastreamento foi confirmada por diversos autores, como Vintzileos *et al.*¹⁰⁻¹², Benacerraf *et al.*¹³⁻¹⁵, Nyberg *et al.*¹⁶⁻¹⁹.

Para utilização de forma confiável e segura do rastreio ultrassonográfico da T21 fetal, é fundamental o conhecimento das alterações ultrassonográficas presentes nesta síndrome e da proporção de fetos normais que também apresentam essas alterações. Estas informações devem ser obtidas por meio de estudo dos elementos morfológicos característicos e frequentes nos fetos com T21 para que se possa conhecer a eficácia do rastreamento ultrassonográfico^{9,20}.

A ultrassonografia morfológica do segundo trimestre, assunto da presente dissertação, é considerada importante para identificar marcadores estruturais que não foram passíveis de detecção precoce, e, desta forma, pode identificar os casos de T21 não detectados no primeiro trimestre^{9,21-26}. No Brasil, muitas pacientes ainda não se submetem ao exame morfológico do primeiro trimestre e têm a oportunidade de se beneficiar sobremaneira do rastreamento no segundo trimestre²⁷.

Os sinais ultrassonográficos morfológicos de segundo trimestre que sugerem a Síndrome de Down são divididos em marcadores maiores e menores^{9,20}. Os marcadores maiores são as malformações estruturais graves, como as anomalias cerebrais, cardíacas, pulmonares, gastrointestinais, dos órgãos genitais e dos membros, as quais comprometem sobremaneira o bem-estar e a qualidade de vida fetal, sendo que, na maioria das vezes, e quando possível, a correção cirúrgica é necessária^{9,13,15,28-32}.

Por sua vez, os marcadores menores são sinais ultrassonográficos não específicos e podem ser transitórios, além de não ameaçar a saúde do feto. São exemplos destes marcadores menores: dilatações do sistema ventricular cerebral e do trato digestivo, nuca espessada, fêmur e úmero

curtos, osso do nariz ausente ou hipoplásico, cistos de plexo coróide, intestino fetal hiperecogênico, foco ecogênico intracardiaco, aumento do ângulo ilíaco, pieloectasia, falange média do quinto dedo dos membros superiores hipoplásica ou ausente, dentre outros^{9,13,15,28-32}.

Sabe-se que, não havendo nenhum sinal absolutamente específico da T21, pequenos sinais estruturais ou de biometria podem ser encontrados em fetos normais em 5 a 14% dos casos (falsos positivos). Por outro lado, de 9 a 15% dos fetos portadores da T21 não apresentam sinais ultrassonográficos alterados (falsos negativos)^{22,24,33,34}. A escolha dos melhores marcadores, assim como dos níveis de corte para cada marcador, tem participação extremamente importante no rendimento do programa de rastreamento.

Dados internacionais mostram que o comprimento do úmero pode ser melhor que o comprimento do fêmur para predizer o risco de T21³⁵⁻⁴³. Segundo Nyberg *et al.*¹⁹, a razão de verossimilhança (RV) para o úmero curto e o fêmur curto como marcadores isolados para T21 foi, respectivamente, de 5,1 e 1,5. Um estudo de Bromley *et al.*³¹, relatou uma RV de 5,8 para o marcador úmero curto e 1,2 para o fêmur curto.

A razão de verossimilhança indica qual é a probabilidade de encontrarmos um teste positivo em uma pessoa com a doença em relação a uma pessoa sem a doença, no caso a síndrome de Down. É expressa matematicamente pela seguinte fórmula: $\text{sensibilidade} / (1 - \text{especificidade})$ ⁴⁴.

Estudos chamam atenção que o comprimento do úmero como marcador para a T21 pode ser influenciado pelas diferenças étnicas⁴⁵, sendo que o rastreamento ultrassonográfico positivo devido ao marcador úmero curto foi mais frequente em todas as etnias não brancas em estudo publicado em 2009⁴⁶.

Até o presente momento, não temos ciência de estudo nacional comparando o comprimento do úmero em fetos com T21 com o comprimento do úmero em fetos normais baseado em valores de referência locais.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos primários

- 1) Comparar o comprimento do úmero em fetos portadores de síndrome de Down (T21) com o comprimento do úmero em fetos normais, utilizando dados de referência da população local⁴⁷;
- 2) Avaliar a sensibilidade e a razão de verossimilhança do marcador úmero curto para a ocorrência de T21 (taxa de falso positivo de 10, 5 e 2,5%).

2.1 Objetivo secundário

Comparar o comprimento do úmero em fetos portadores de síndrome de Down (T21) com o comprimento do úmero em fetos normais, segundo a curva de crescimento umeral de Jeanty.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3 REVISÃO DA LITERATURA

Até 35 anos atrás, não havia método conhecido para identificar fetos com Síndrome de Down por meio da ultrassonografia, com exceção de alguns fetos com defeitos cardíacos maiores ou outras anormalidades estruturais muito evidentes¹². Apenas mulheres com idade materna avançada ou história prévia de feto com cromossomopatia eram candidatas aos procedimentos diagnósticos invasivos, e essas correspondiam apenas a 25-30% das gestações com fetos portadores de síndrome de Down, deixando a vasta maioria dos fetos com T21 sem detecção pré-natal^{3,48}. Enquanto 25% dos fetos com Síndrome de Down no segundo trimestre têm uma malformação maior reconhecível pela ultrassonografia, a maioria dos fetos afetados passam despercebidos se apostarmos na malformação como método primário de detecção^{9,15,30,31}

Tendo a imagem dos aparelhos de ultrassonografia melhorado em qualidade nas últimas duas décadas, há várias características de indivíduos com T21 que foram reconhecidas na população fetal, tais como pele redundante na parte de trás do pescoço, *fascies* achatada, nariz pequeno e ossos longos encurtados. Esses achados, assim como outros que são específicos do ultrassom fetal, tais como intestino hiperecogênico, foco ecogênico intracardíaco e pieloectasia, estão atualmente, sendo usados para identificar fetos com alto risco para síndrome de Down no segundo trimestre de gestação^{20,32,34,35}. Apesar da Síndrome de Down não ser diagnosticada sem um cariótipo, na presença desses marcadores ultrassonográficos, particularmente em mulheres com risco aumentado devido à idade materna avançada ou rastreio sorológico anormal, o aconselhamento quanto à realização de teste diagnóstico (invasivo ou não invasivo) deve ser indicado visando ao diagnóstico definitivo^{24,26,49,50}.

Os estudos apontam que os fetos com T21 têm maior tendência a apresentarem medidas curtas dos ossos longos comparadas com a população de fetos normais^{14,17,24}. A partir desta constatação, diversos estudos na literatura adotaram a medida do comprimento dos ossos longos, principalmente fêmur e úmero, como marcadores ultrassonográficos para identificação de fetos com risco aumentado para a T21^{40-42,51-53}.

Fitz Simmons *et al.*⁵⁴, em 1989, em seu trabalho intitulado crescimento de ossos longos em fetos com síndrome de Down, mediram o comprimento dos ossos longos em 31 casos de T21 e 174 controles normais *post-mortem* para determinar quais ossos eram melhores preditores da T21. Descobriram que, em 31 fetos com Síndrome de Down usando um nível de corte de dois desvios-padrão abaixo do normal, 3 tinham fêmur curto, 4 tibia curta, 5 fíbula curta, 9 úmero curto, 10 rádio curto e 7 ulna curta. Desta maneira, concluíram que os ossos longos dos membros superiores eram mais curtos que o normal com maior frequência que os ossos dos membros inferiores.

Em 1991, Rodis *et al.*³⁷ demonstraram que 67% de 11 fetos com T21 apresentavam comprimento do úmero abaixo do percentil 5, enquanto apenas 18% dos fêmures fetais encontravam-se abaixo do percentil 5 nesse mesmo estudo. Demonstraram, assim, a maior sensibilidade do úmero na detecção da T21³⁷.

Benacerraf *et al.*⁵², em 1991, descobriram que 12 de 24 fetos (50%) com Síndrome de Down apresentavam úmero encurtado comparado com 6,25% dos 400 controles normais. Nesse mesmo estudo, a combinação do úmero curto com a nuca espessada identificou 75% dos fetos com T21. Este mesmo grupo de pesquisadores, em 2002, publicou um trabalho que mostrou uma RV de 5,8 para o marcador úmero curto isolado em 164 fetos com T21³¹.

Nyberg *et al.*, em 1993⁴⁰, em seu estudo sobre o comprimento diminuído do úmero e do fêmur para a detecção de fetos com T21, evidenciou que 24,4% dos fetos com Síndrome de Down tinham úmero curto, enquanto no grupo-controle de fetos normais apenas 4,5% apresentavam este marcador positivo.

Em 2001¹⁷, estes mesmos autores publicaram um estudo para determinar quais marcadores ultrassonográficos estavam associados com a T21 durante o segundo trimestre de gestação e estimar o grau de risco dos marcadores individuais usando razão de verossimilhança. Avaliaram os achados ultrassonográficos em 186 fetos com T21 entre 14 e 22 semanas de gestação, e compararam com um grupo-controle de 8.728 fetos normais. Dentre os marcadores avaliados, estava incluído o úmero curto. A RV do achado de úmero curto como marcador isolado foi de 5,1¹⁷.

Em 1994, Johnson *et al.*⁵⁵ estudaram a relação do comprimento do úmero sobre o comprimento do pé. Utilizando o ponto de corte de 0,85 para o úmero e 0,99 para o pé, 47% dos casos de Síndrome de Down foram detectados, com taxa de falso positivo de 8,1%.

Vintzileos *et al.*¹⁰ publicaram, em 1995, uma revisão da literatura que estimava a sensibilidade e especificidade de vários marcadores para a T21. Esse estudo evidenciou que a sensibilidade do marcador úmero curto para detecção de T21 foi de 33%.

Em 1996, esse mesmo grupo avaliou a eficácia da medida do comprimento dos ossos longos, incluindo fêmur, úmero, tíbia e fíbula na detecção de T21⁵³. Foram avaliadas 515 gestantes entre 14 e 23 semanas de gestação, sendo 493 fetos com cariótipo normal e 22 com T21. A sensibilidade da presença de um ou mais ossos longos curtos foi de 63,6%, com especificidade de 78,5%, sendo o comprimento do úmero o de melhor sensibilidade (45,5%). Os riscos de Síndrome de Down baseados na idade materna e no comprimento dos ossos longos foram calculados segundo o teorema de Bayes, de forma que os riscos aumentavam na presença de um ou mais ossos curtos e diminuía quando o comprimento dos ossos longos era normal⁵³.

Em um estudo de Bahado-Singh *et al.* (2001)³⁶ com 94 casos de T21 e 4.700 fetos com cariótipo normal, o comprimento do úmero associado à idade materna identificou 55,1% dos fetos com T21, com taxa de falso positivo de 22,1%. Já a idade materna associada à prega nucal identificou 66,7% dos fetos com síndrome de Down com a mesma taxa de falso

positivo. Quando o comprimento do úmero foi associado à prega nugal como um grupo-combinado de marcadores, 79,8% dos fetos com T21 puderam ser identificados também com taxa de falso positivo de 22,1%, mostrando, assim, que os marcadores juntos aumentam a chance de detecção de T21³⁶.

Em 2002, um grupo da Tailândia⁵⁶ publicou um estudo sobre o valor do encurtamento do úmero para a detecção pré-natal de fetos com T21 em uma população local. Nesse estudo, foram detectados 24 fetos com T21 para um grupo-controle de 3.003 fetos normais. Todos os casos foram oriundos de estudo prospectivo, feito com 3.053 mulheres que se submeteram à amniocentese no segundo trimestre, entre 16 e 24 semanas de gestação, por idade materna avançada ou história de cromossomopatia em gestação prévia. Uma razão de 0,91 para comprimento encontrado sobre comprimento esperado do úmero teve uma sensibilidade de 41,7% com especificidade de 88,3 %, para uma taxa de falso-positivo de 11,7%. A RV de um resultado positivo do teste foi de 3,63 para a detecção de T21⁵⁶.

Em 2007, Bethune³⁵ publicou uma revisão da literatura e protocolo de sugestão no manejo dos marcadores menores, dentre eles, o úmero curto. Comentou que, na maioria das séries, as medidas esperadas foi calculada a partir de informações internas para aquele determinado grupo de pesquisa. Quase todos os estudos, até aquele momento, mostravam que o úmero é um discriminador mais confiável para a T21 que o fêmur. De fato, a partir dessa revisão, o úmero parecia ser o marcador mais importante, depois do osso nasal e da prega nugal. Recomendou que a medição do úmero deve tornar-se parte da avaliação ultrassonográfica de rotina no segundo trimestre.

Gray *et al.* (2009)⁴², em um estudo de caso-controle, analisou o comprimento do úmero numa população normal e comparou com o comprimento do úmero em fetos com Síndrome de Down para determinar o parâmetro discriminatório mais eficiente para a acurácia do diagnóstico. Vários parâmetros discriminatórios para úmero curto foram avaliados quanto à eficiência em detectar a T21, com intervalo de confiança de 95%. São eles: comprimento observado/esperado do úmero, Diâmetro Biparietal (DBP),

comprimento do úmero maior que 1,3;1,4;1,5;1,6;1,7;1,75;1,8;1,85 desvios-padrão acima da média para a idade gestacional, comprimento do úmero menor que 0,8 ou 0,9 múltiplos da mediana, e comprimento do úmero menor que o percentil 5 para a idade gestacional. Os resultados apontaram que o comprimento do úmero abaixo do percentil 5 foi o melhor parâmetro dentre aqueles avaliados para prever a T21. A RV positiva foi de 25 para o úmero abaixo do percentil 5, com taxa de falso positivo de 1,5%. Quando o úmero foi considerado isoladamente, sem outro marcador ultrassonográfico de T21, a RV positiva foi de 6,3⁴², também com taxa de falso positivo de 1,5%.

Também em 2009, Bottalico *et al.*³², em um trabalho intitulado sonograma genético do segundo trimestre para detecção de cromossomopatias em uma unidade de teste antenatal de base comunitária³², estudaram 660 gestações de alto e baixo risco para cromossomopatias, das quais 12 fetos tinham T21. O marcador úmero curto teve uma sensibilidade entre o grupo considerado de alto risco para T21 de 18,18%, com RV de 16,85. Já no grupo de baixo risco para T21, a sensibilidade do marcador úmero curto foi de 16,67%, com RV de 13,08.

Uma meta-análise dos marcadores ultrassonográficos do segundo trimestre para a T21, publicada em 2013⁵⁷, na qual foram incluídos um total de 48 estudos, revelou que a razão de verossimilhança positiva para o marcador úmero curto foi de 4,81. Os organizadores concluíram que a presença de marcadores ultrassonográficos aumenta o risco para síndrome de Down, porém a maioria dos marcadores, dentre eles, o comprimento do úmero, tem um efeito pequeno em modificar a probabilidade (risco) de T21 fetal estipulada antes da realização da ultrassonografia (risco pré-teste).

Avaliando os diversos estudos publicados, observa-se que todos conferem alguma importância ao marcador úmero curto para a detecção da T21 no segundo trimestre de gestação. Porém, até o momento, não dispõem-se de publicações que versem sobre este assunto em populações brasileiras.

Algumas publicações abordam a problemática de utilizar dados de referência não oriundos de populações locais como base para o cálculo do

valor esperado do úmero em relação ao comprimento encontrado em fetos normais e com T21^{45,46,58,59}. Nesse sentido, o estudo de Ogasawara *et al.*⁴⁶ teve o objetivo de avaliar se a biometria fetal ao ultrassom era afetada pelas diferentes etnias, comparadas com os controles da raça branca na detecção da T21, e concluiu que o ultrassom morfológico do segundo trimestre era positivo para presença de ossos longos curtos mais frequentemente em todas as etnias não brancas.

Vale salientar que uma parcela considerável das gestantes locais não realiza o rastreamento para a T21 no primeiro trimestre, ou fica na dúvida frente ao resultado de risco intermediário para a Síndrome de Down no primeiro trimestre, e esperam a realização da ultrassonografia morfológica do segundo trimestre para a tomada de decisão se irão ou não se submeter a um teste diagnóstico para pesquisa de cariótipo fetal^{26,60,61}.

Diante de tudo o que foi exposto, vê-se valor e necessidade de ter-se dados que reflitam a realidade local, sendo aplicável às pacientes locais e ressalta-se a importância de um estudo com as características propostas, que visa comparar o comprimento do úmero de fetos normais oriundos de uma população local com o comprimento do úmero de fetos sabidamente portadores da T21.

4 CASUÍSTICA E MÉTODO

4 CASUÍSTICA E MÉTODO

4.1 Tipo de estudo

Este foi um estudo caso-controle retrospectivo que comparou o comprimento do úmero em fetos normais com o comprimento do úmero em fetos sabidamente portadores da síndrome de Down, oriundos de população local.

4.2 Local do estudo

O estudo foi realizado no Setor de Medicina Fetal da Clínica Obstétrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), que representa um centro terciário de referência em saúde, credenciado como hospital escola, voltado para o ensino e a pesquisa.

4.3 Coleta de dados

A coleta de dados foi realizada em base de dados eletrônica da Clínica Obstétrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

4.4 Seleção de pacientes

4.4.1 Grupo dos casos com síndrome de Down

Foram selecionados os dados dos exames ultrassonográficos no segundo trimestre de gestação, entre 18 e 23 semanas e 6 dias, de pacientes com fetos sabidamente portadores de T21. Os exames foram realizados entre janeiro de 1994 e agosto de 2012. Os cariótipos foram obtidos por meio de exames invasivos durante a gestação ou coleta de sangue pós-natal, após suspeita clínica baseada no fenótipo do recém-nascido.

4.4.2 Grupo dos controles normais

Os controles normais foram oriundos de uma população de pacientes que se encontravam entre 18 e 23 semanas e 6 dias de gestação, as quais foram avaliadas ultrassonograficamente no setor de medicina fetal da clínica obstétrica do HCFMUSP entre agosto de 2007 e dezembro de 2009⁴⁷. O cariótipo normal ou fenótipo não sugestivo de T21 foi confirmado em todos os pacientes.

4.5 Critérios de Inclusão

4.5.1 Casos

No grupo dos casos, foram incluídas gestações com as seguintes características:

- Gestação única com feto vivo;
- Idade gestacional entre 18 semanas e 23 semanas e 6 dias, calculada pela data da última menstruação (DUM) referida ou pelo comprimento cabeça-nádegas (CCN) em ultrassonografia realizada no primeiro trimestre;
- Cariótipo confirmado de T21 por exame fetal ou pós-natal.

4.5.2 Controles

No grupo-controle, foram incluídas gestações que atendessem os critérios a seguir:

- Gestação única com feto vivo;
- Idade gestacional entre 18 e 23 sem e 6 dias estabelecida pela DUM ou medida do CCN em exame ultrassonográfico do primeiro trimestre;
- Cariótipo fetal normal confirmado por exame pré ou pós-natal, ou, ainda, fenótipo não característico de T21 no recém-nascido;
- Fetos que não apresentavam anidrâmnio ou alteração de Doppler ao exame ultrassonográfico;

- Ausência de malformação maior, como: anencefalia, onfalocele, gastrosquise, brida e múltiplas malformações.

4.6 Variáveis analisadas

- Idade materna, em anos;
- Idade gestacional, em semanas;
- Comprimento do útero, em milímetros, usando duas casas decimais.

4.7 Datação da gestação

A idade gestacional dos casos e controles foi obtida pela DUM e comparada com exames ultrassonográficos do primeiro trimestre de gestação, até a 14 semana.

4.8 Equipamentos de ultrassonografia utilizados

Foram utilizados os equipamentos de ultrassonografia disponíveis no ambulatório de medicina fetal do HCFMUSP durante o período da realização dos exames, sendo eles: Envisor (Philips Healthcare, Eindhoven, Holanda), Voluson 730 Pro ou Voluson 730 Expert (GE Healthcare, Milwaukee, WI, Estados Unidos).

4.9 Técnica de medida do úmero

O comprimento do úmero foi obtido pela técnica padrão já bem estabelecida na literatura para a medida dos ossos longos fetais⁶²⁻⁶⁴. Assim, foi realizado o corte longitudinal do membro superior fetal, estando o osso em um ângulo próximo a 30 graus com o feixe de ondas do transdutor e a imagem do úmero ocupando pelo menos 50% da tela. Foi sempre medido o úmero mais próximo do transdutor, independente de ser o direito ou o esquerdo. A medida foi realizada em milímetros, do limite proximal à extremidade distal da diáfise do osso, podendo incluir até uma casa decimal. Uma segunda casa decimal, em casos em que o aparelho assim permitia, foi arredondada para mais, se fosse 0,05, ou mais e para menos, caso fosse 0,04 ou menos.

4.10 Análise estatística dos dados

As informações coletadas foram armazenadas em planilha eletrônica do programa Microsoft Excel 2003 (Redmond, Estados Unidos) e analisadas por métodos estatísticos utilizando o pacote estatístico SPSS 20.0 (IBM, Estado Unidos).

Foram analisadas as médias, medianas e desvios-padrão da idade materna (anos) e da idade gestacional (semanas), nos dois grupos.

4.10.1 Análise do comprimento do úmero

4.10.1.1 Grupo Controle

Foi utilizado o resultado de estudo anterior realizado no serviço⁴⁷ no qual a análise do comprimento do úmero foi feita por meio da observação dos valores mínimos e máximos para cada idade gestacional, e foram calculadas as médias, medianas e desvios-padrão.

Nesse estudo⁴⁷, também foi feita análise da correlação entre as medidas dos úmeros e a idade gestacional sendo seus valores expressos em múltiplos da mediana (MoMs) com o propósito de eliminar a interferência da idade gestacional. A transformação em MoMs foi considerada bem sucedida quando o percentil 50 se situava próximo a 1,0 MoM e a correlação entre os MoMs e a idade gestacional ficava próxima a zero ($p < 0,05$). Foi ainda determinado o percentil 2,5 da medida do úmero em MoMs.

Para determinar a medida do úmero esperado em função da idade gestacional derivou-se a equação: $U = - 43,57 + 4,964 x - 0,06246 x^2$, onde “U” é o valor do úmero esperado e “x” é a idade gestacional em semanas.

Em re-análise da planilha de dados dos controles⁴⁷, estimou-se para o presente estudo os percentis 10 e 5, considerando-se as taxas de falso positivo.

4.10.1.2 Comparação dos casos de T21 com o grupo controle

Após transformação em MoMs, os dados do comprimento do úmero dos fetos com T21 foram, então, confrontados com a distribuição do comprimento do úmero de fetos normais oriundos dos dados da população normal obtido em nosso serviço⁴⁷, utilizando o teste t-Student⁴⁴.

Foram calculadas as taxas de sensibilidade da medida do úmero como rastreador da síndrome de Down fetal considerando-se os percentis 10, 5 e 2,5 (grupo controle). Calculou-se, ainda, a razão de verossimilhança (RV) que trata-se de recurso estatístico que mostra quantas vezes mais chance temos de encontrar um teste positivo em uma pessoa com a doença em relação a uma pessoa sem a doença, no caso a síndrome de Down. A RV é expressa matematicamente da seguinte forma: sensibilidade / 1 - especificidade⁴⁴.

Além dessa análise inicial da comparação do comprimento dos úmeros de fetos normais com fetos portadores da T21, foi utilizado um modelo linear geral tendo a idade materna como covariável para controlar na comparação e novamente confrontados os grupos⁶⁵. Foram observadas as idades maternas dos fetos com T21 e criadas faixas etárias de 3 em 3 anos, começando em 27 até 46 anos. Para cada faixa etária foi feita uma seleção aleatória de 4:1 dos fetos normais cujas mães possuem a mesma faixa etária, com exceção da última faixa etária, pois o número de fetos normais foi insuficiente, então foram considerados todos os fetos (10 fetos e seriam necessários 12 fetos) para esta faixa etária materna.

Comparou-se, também, a medida do comprimento do úmero, em milímetros, para uma determinada faixa de idade gestacional (18 a 23 semanas e 6 dias), em semanas, dos nossos fetos normais e com T21 com o comprimento do úmero esperado, não só de acordo com a curva de referência da população local mas também com os resultados obtidos na curva de Jeanty⁶², que trata-se da curva de úmero mais utilizada em nossos aparelhos de ultrassonografia nos dias atuais.

Para o cálculo do úmero esperado de acordo com o estudo de Jeanty⁶² foi usada a seguinte equação: $U = - 36,93 + 4,33 x - 0,04 x^2$, em que "U" é o valor do úmero esperado e "x" é a idade gestacional em semanas.

Todos os testes foram realizados com nível de significância de 5%.

4.11 Aspectos éticos

O presente estudo obedeceu aos postulados da Declaração de Helsinque, bem como as normas da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

Não foi necessária a utilização do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, uma vez que se tratou de levantamento de dados retrospectivos.

Os exames ultrassonográficos foram realizados na própria Instituição (HCFMUSP), seguindo as normas já existentes para tal procedimento.

O protocolo de estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CAPPesq 0019/11) (Anexo A).

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização da população

5.1.1 Casos

No grupo dos fetos com T21, havia um total de 55 casos dentro dos critérios de inclusão propostos.

A idade materna variou de 27 a 46 anos, cuja média foi de 38,4 anos, com desvio-padrão de 4,03 e mediana de 39 anos. Do total, 81% das pacientes tinham idade igual ou maior que 35 anos.

Desses 55 casos, 52 foram diagnosticados como T21 no pré-natal e 3 no período pós-natal.

5.1.2 Controles

Um total de 1.888 pacientes, com feto vivo e gestação única, sem malformação maior identificada na ultrassonografia, foram recrutadas para o grupo-controle a partir de um protocolo de pesquisa realizado em nossa instituição⁴⁷.

A idade materna média nesse grupo foi de 29,5 anos com desvio-padrão de 6,7 e mediana de 29,2 anos. Dessas pacientes, 22,6 % tinham idade igual ou maior que 35 anos.

O fenótipo não sugestivo de T21 foi confirmado em todos os recém-nascidos.

5.2 Exames ultrassonográficos

5.2.1 Casos

A idade gestacional média da realização dos exames ultrassonográficos neste grupo foi de 20,9 semanas, com desvio-padrão de 1,51 e mediana de 20,75 (18 a 23,9) semanas.

A medida do úmero teve uma média de 30,52 mm com desvio-padrão de 3,71 e mediana de 30 (22,5 – 39) mm.

A média do úmero, após transformação em MoMs, foi de 0,934, com mediana de 0,942 (0,686 – 1,107) e desvio-padrão de 0,074 ($p < 0,05$).

5.2.2 Controles

No grupo dos controles, a idade gestacional média da realização dos exames ultrassonográficos foi de 20,6 semanas, com desvio-padrão de 0,93 e mediana de 20,4 (18 a 23,9) semanas.

A medida do úmero teve uma média de 32,76 mm, com desvio-padrão de 3,56 e mediana de 32,79 (25,93 – 39,30) mm.

Após a conversão em MoMs, a média da medida do úmero foi de 0,997 com desvio-padrão de 0,058 e mediana de 0,996 (0,65 – 1,42).

O valor do úmero, em MoM, encontrado para o percentil 10 foi de 0,927516, para o percentil 5 foi de 0,903472 e para o percentil 2,5 foi de 0,890444.

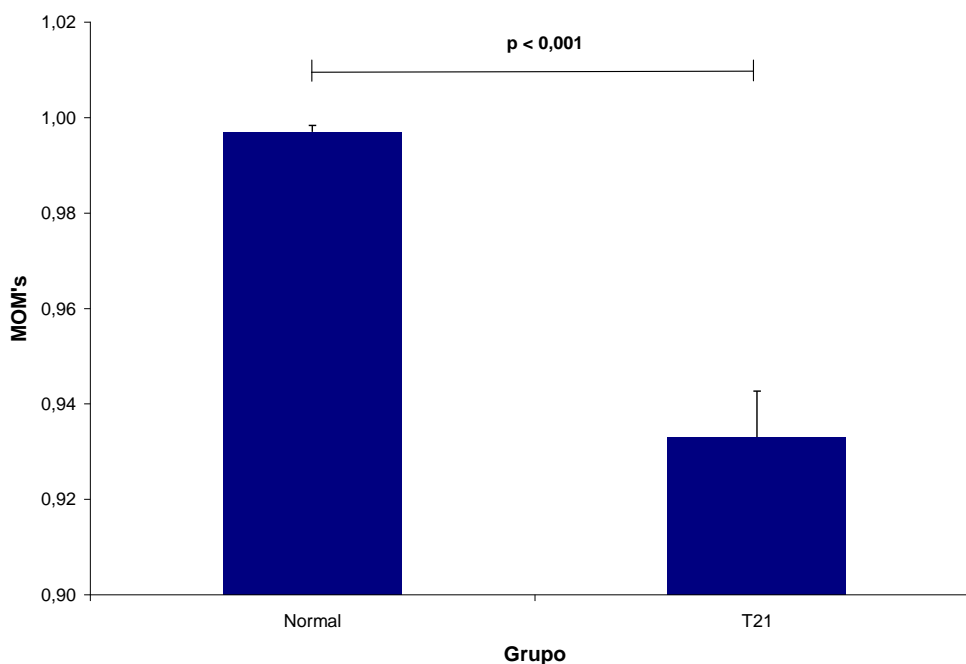
A tabela 1 resume os dados encontrados nos dois grupos estudados.

Tabela 1 - Descrição dos resultados dos grupos controle e casos.

	MÉDIA ± DP		MEDIANA		P
	Normal	T21	Normal	T21	
IG	20,6 (± 0,93)	20,9 (± 1,51)	20,4 (18 -23,9)	20,7 (18 -23,9)	0,097
Medida do úmero	32,76 (± 3,56)	30,52 (± 3,71)	32,79 (25,93 – 39,30)	30,0 (22,5 - 39,0)	< 0,001
Medida do úmero (MoM)	0,997 (± 0,058)	0,934 (± 0,074)	0,996 (0,65 - 1,42)	0,942 (0,686 - 1,107)	< 0,001

O gráfico 1 foi elaborado a partir dos valores médios dos úmeros, em MoMs, dos grupos estudados, baseados na equação de normalidade derivada dos controles normais da população local. Os resultados foram ilustrados com uso de gráfico de barras representando as médias dos MoMs, com os respectivos erros padrões.

Esse gráfico mostra que o valor médio dos úmeros, em MoMs, de fetos com T21 é estatisticamente inferior ao valor médio dos fetos normais ($p < 0,001$), utilizando o teste t-Student⁴⁴.

Gráfico 1 - Valores médios dos úmeros (MoMs) considerando a equação de normalidade para fetos da população local e respectivos erros padrões segundo grupos e resultado do teste.

O valor do úmero, em MoM, encontrado para o percentil 10 foi de 0,927516, para o percentil 5 foi de 0,903472 e para o percentil 2,5 foi de 0,890444.

A sensibilidade do comprimento do úmero para a detecção da T21 utilizando o nível de corte (taxa de falso positivo) abaixo do percentil 10 foi de 47,2 % (26 casos), abaixo do percentil 5 foi de 34,5 % (19 casos) e abaixo do percentil 2,5 foi de 30,9 % (17 casos).

Em termos de razão de verossimilhança, calculada de acordo com o percentil avaliado, tivemos os seguintes resultados: RV de 4,4 para úmero abaixo do percentil 10, RV de 6,9 para o úmero abaixo do percentil 5 e RV de 12,0 para úmero abaixo do percentil 2,5.

5.2.3 Análise dos dados controlando-se a idade materna

A proporção de mães com idade acima de 35 anos entre os dois grupos teve uma diferença estatisticamente significativa (81 % nos casos e 22,6 % nos controles; $p < 0,0001$). Assim, optou-se por verificar se a idade materna influencia nessa comparação, controlando esse fator.

Foi utilizado um modelo linear geral com a idade materna como covariável para controlar e novamente comparados os dois grupos⁶⁵. Quando controlada a idade materna na comparação entre os grupos, a diferença média dos MoMs entre os grupos permanece estatisticamente significativa ($p < 0,001$).

Na análise realizada, após pareamento 4:1 (controles:casos) foram comparados entre os dois grupos: os MoMs dos úmeros, as idades maternas e as idades gestacionais (Tabela 2).

Tabela 2 - Descrição da idade gestacional, idade materna e MoMs dos fetos com T21 e fetos normais selecionados e resultado dos testes comparativos.

Variável	Grupo	Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo	N	P
Idade (anos)	Normal	38,64	4,08	39,25	27	47	218	0,788
	T21	38,47	4,03	39,00	27	46	55	
Idade gestacional (semanas)	Normal	20,64	0,93	20,57	18,14	23,29	218	0,214
	T21	20,90	1,51	21,00	18,14	23,86	55	
MoM	Normal	1,01	0,06	1,01	0,77	1,19	218	<0,001
	T21	0,93	0,07	0,94	0,69	1,11	55	

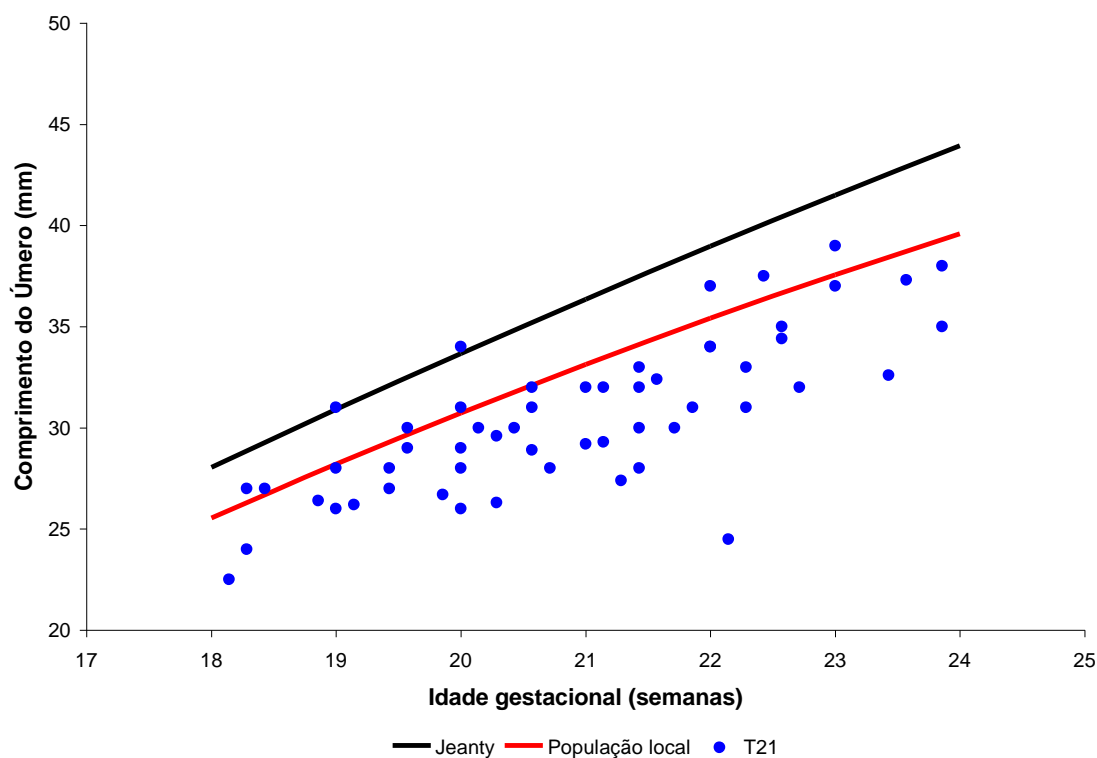
A Tabela 2 mostra que a seleção dos fetos normais fez com que as idades maternas médias fossem estatisticamente semelhantes ($p = 0,788$). Não há diferença média nas idades gestacionais entre fetos T21 e fetos normais selecionados ($p = 0,214$) e os fetos com T21 apresentam, em média, comprimento do úmero em MoMs estatisticamente menor que fetos normais ($p < 0,001$).

5.2.4 Análise comparativa entre o comprimento do úmero esperado segundo equação de Jeanty e curva da população local e o observado em fetos com T21

Somando-se aos resultados já expostos, fez-se uma análise para comparar o comprimento do úmero esperado para os fetos normais da população local⁴⁷ com o comprimento do úmero esperado para a curva de Jeanty⁶².

Para efeito de comparação visual, foi projetado o percentil 50 das curvas de normalidade de fetos da população local⁴⁷ e da curva de Jeanty⁶² e plotados os fetos com T21 no mesmo gráfico para verificar as diferenças entre as curvas (gráfico 2).

Gráfico 2: Curvas de normalidade do úmero segundo idade gestacional e valores dos fetos com T21.



O Gráfico 2 sugere que até mesmo os fetos normais brasileiros teriam o comprimento do úmero inferiores aos fetos normais do estudo da Bélgica⁶², pois a curva de normalidade do úmero para fetos da população local é praticamente 5mm inferior à curva de Jeanty em todas as idades gestacionais.

Os fetos com T21 apresentam, em sua maioria (46 fetos), valores abaixo do percentil 50 de ambas as curvas. Porém, nove fetos com T21 estariam acima do percentil 50 pela curva local e dois segundo a curva de Jeanty.

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A Síndrome de Down é a cromossomopatia mais frequente em nosso meio e representa a principal causa de comprometimento cognitivo nas crianças¹. Sua prevalência é de, aproximadamente, 1/1000 nascidos vivos^{2,3}.

Há 35 anos, não havia teste de rastreamento confiável e universalmente aceito para a T21⁹. Desde então, vários métodos de rastreamento por meio de exames ultrassonográficos e laboratoriais foram desenvolvidos com o intuito de melhorar a detecção dessa síndrome no período pré-natal⁹.

Atualmente, o rastreamento recomendado para detecção precoce da T21 é o teste combinado, que compreende a ultrassonografia morfológica de primeiro trimestre realizada entre 11 semanas e 13 semanas e 6 dias de gestação, na qual se avalia a medida da translucência nucal associada à idade materna e aos exames laboratoriais para dosagem sérica de PAPP-A e BHCG livre⁶⁶⁻⁶⁹, assim como a pesquisa de DNA fetal circulante no sangue materno em alguns casos. Além disso, pode-se pesquisar outros marcadores qualitativos no primeiro trimestre como o osso nasal, o ducto venoso e a regurgitação tricúspide^{69,70}, especialmente nos casos com risco intermediário entre 1/100 e 1/1000 após o rastreamento combinado⁷¹.

Todavia, em muitas partes do mundo, inclusive no Brasil, o rastreamento de primeiro trimestre não está disponível para a maioria da população. Ou, ainda, essas mulheres comparecem tardiamente para fazer a ultrassonografia, ficando de fora do período ideal para fazer esse rastreamento conforme preconizado por várias entidades mundiais, dentre elas, a *Fetal Medicine Foundation* (FMF) e a *American College of Obstetricians and Gynecologists* (ACOG)²⁶.

Dessa forma, o rastreamento por meio da ultrassonografia morfológica do segundo trimestre de gestação, criado a partir dos anos 80 e utilizando a

presença de alterações morfológicas e biométricas de caracteres presentes nos indivíduos com T21, pode ser uma opção para essas mulheres.

O papel do ultrassom morfológico do segundo trimestre de gestação também tem importância em pacientes que tiveram o *screening* do primeiro trimestre positivo, em especial naquelas com riscos intermediários, porém ainda não se decidiram se vão prosseguir na investigação do cariótipo fetal por meio do diagnóstico pré-natal invasivo ou pesquisa de DNA fetal circulante no sangue materno, e preferem aguardar as evidências a favor ou contra a T21 no morfológico de segundo trimestre^{25,26,34,61,72}.

É útil, ainda, para pacientes que, quer pela idade materna, quer pelo antecedente, têm risco basal considerado alto e que querem acentuar o valor preditivo negativo já obtido no primeiro trimestre, utilizando rastreamento sequencial com dados de ultrassom no segundo trimestre^{34,57,73-75}. Nesse contexto, o comprimento do úmero constitui uma ferramenta útil, associado ou não aos demais marcadores.

No presente estudo, abordamos a medida do úmero como marcador da T21 no segundo trimestre de gestação.

Cinquenta e cinco com Síndrome de Down preencheram os critérios de inclusão proposto neste trabalho, com o grupo-controle de fetos normais de nossa população constituído de 1.888 casos. Nosso material demonstra que há correlação entre o comprimento do úmero e a presença de T21 fetal, e conseguimos estipular o rendimento do marcador úmero curto com base nos controles normais da população local, o que não existia em nossa literatura.

Não há consenso, na literatura, quanto à definição de úmero curto, sendo adotados vários parâmetros. Os mais utilizados e aceitos são: relação do úmero observado/esperado para determinado DBP; relação do úmero observado/esperado para determinada idade gestacional; e úmero abaixo de determinado percentil da curva de normalidade.

Em nossa metodologia, avaliamos a medida do úmero em fetos normais da população local e comparamos aos nossos fetos com T21. Foi utilizada a seguinte equação para a medida esperada do úmero: $U = - 43,57 + 4,964 x - 0,06246 x^2$, onde o "x" é a idade gestacional. Utilizamos os níveis

de corte para a medida do úmero encontrado para determinada idade gestacional abaixo dos percentis 2,5, 5 e 10.

A sensibilidade do marcador úmero curto, quando utilizada um nível de corte abaixo do percentil 10, foi de 47,2 %, com RV de 4,4. Para o úmero abaixo do percentil 5, a sensibilidade foi de 34,5%, com RV de 6,9. E para o percentil 2,5 , a sensibilidade foi de 30,9 %, com RV de 12. Esses achados foram compatíveis com vários estudos que encontramos na literatura^{17,31,40,42,53,56,75}.

Benacerraf e colaboradores preconizam uma relação entre o úmero medido/úmero esperado $\leq 0,90$ em relação ao diâmetro biparietal, sendo que a medida do úmero esperado é baseada na seguinte fórmula: $U = - 7,9404 + 0,8492 \times DBP^{52}$. Esses pesquisadores encontraram uma sensibilidade de 50%, com taxa de falso positivo de 6,25%⁵².

Já Nyberg e colaboradores adotam o valor da relação úmero medido/úmero esperado $\leq 0,89$ também em relação ao diâmetro biparietal, sendo que o úmero esperado baseia-se na fórmula: $U = - 0,884 + 0,834 \times DBP^{17,40}$. Em estudo com 45 fetos com T21, tiveram uma sensibilidade de 24,4%, com taxa de falso positivo de 4,5% e RV de 5,4⁴⁰.

No estudo de Bromley *et al.*³¹, utilizando-se o parâmetro de comprimento do úmero encontrado/esperado $< 0,90$, a sensibilidade para esse marcador em detectar a T21 no segundo trimestre foi de 48,7 % com uma RV de 23,5. Quando considerado este marcador de forma isolada, a sensibilidade caiu para 2% e a RV para 5,8, demonstrando que o úmero curto é mais importante associado aos outros marcadores.

O primeiro estudo a utilizar o parâmetro do úmero abaixo do percentil 5 para detecção de fetos com T21 foi o de Rodis *et al.*³⁷ em 1991. Esse estudo demonstrou uma sensibilidade de 64% do úmero na detecção da T21, com RV de 12,8 e taxa de falso positivo de 5%.

Van den Hof e Wilson⁷⁶ também preferem definir o ponto de corte como determinado percentil na curva de normalidade. Assim, sugerem que, para fins de rastreamento em que múltiplos parâmetros são incorporados, é interessante usar um ponto de corte restritivo como o percentil 2,5.

O estudo de Gray e colaboradores⁴² avaliou o comprimento do úmero em fetos normais e em fetos com T21 para determinar qual o parâmetro discriminatório mais eficiente para acurácia no diagnóstico dessa síndrome. A equação por eles utilizada para a medida do úmero esperado para determinada idade gestacional é a seguinte: $U = - 3,527 + 0,417 x - 0,004 x^2$, em que “x” é a idade gestacional em semanas. Analisando os vários parâmetros, concluíram que o melhor preditor para a T21 é o comprimento do úmero abaixo do percentil 5, com sensibilidade de 37,5 % e taxa de falso positivo de 1,5%, além de uma razão de verossimilhança de 25.

Achamos que o método que utiliza a relação do úmero encontrado/esperado em relação ao DBP pode ser menos adequado, uma vez que se baseia em duas medidas biométricas, o que aumenta o viés de aferição. Sobre isso, Cuckle opina que o problema com as definições que envolvem relações entre duas variáveis biométricas é que a imprecisão de uma medida soma-se à da outra⁷⁷; além de que a própria relação pode variar com a idade gestacional.

A maior parte dos estudos na literatura sobre o úmero como marcador para T21 não reporta seus valores em múltiplos da mediana (MoMs)⁶⁹. Porém, consideramos que essa abordagem é preferível para poder eliminar a interferência da idade gestacional e optamos por ela em nosso estudo, além de essa ser uma tendência mais atual.

Uma limitação do nosso estudo é que o período de realização dos exames entre os grupos controle normal e casos com T21 foi diferente, sendo este último iniciado em 1994, podendo os equipamentos de ultrassonografia ter limitado a avaliação dos casos.

Úmero curto como marcador menor para a T21 pode ser influenciado pela etnia e isso tem impacto considerável no risco positivo de aneuploidia⁵⁸. Sem dúvidas, diferenças étnicas na diáfise do úmero tem um impacto considerável no rastreamento da T21. Em um estudo asiático⁴⁶, resultados ultrassonográficos positivos para presença de úmero curto foram relatados, mais frequentemente, em etnias não brancas.

A acurácia em detectar a T21 depende também dos controles normais usados para definir os limites de normalidade e os resultados ainda vão variar entre as instituições. Isso implica que, idealmente, cada centro deveria determinar sua própria taxa de sensibilidade, especificidade e falso positivo para a T21 antes de usar o comprimento do úmero como ferramenta de rastreamento no segundo trimestre⁴³. Nosso estudo baseou-se num grupo-controle grande de nossa população local que é multirracial.

Notamos, ainda, no decorrer deste estudo, que a curva internacional para comprimento do úmero de Jeanty⁶², consagrada na literatura e em uso em praticamente todos os aparelhos de ultrassonografia do mundo, não tem rendimento adequado para uso como controle do crescimento umeral em fetos normais na nossa população. O comprimento do úmero dos fetos do presente estudo, quando distribuídos na curva belga, apresentam valores menores que o esperado na distribuição normal, acarretando com seu uso o inevitável aumento da taxa de falsos positivos de úmeros curtos para serem usados como marcador da T21 fetal. Fica claro que é pertinente dispor de uma curva local para os dados de crescimento do úmero fetal.

A maioria dos países em desenvolvimento, dentre eles o Brasil, não dispõem de uma política nacional de rastreamento para aneuploidias e malformações²⁷. O diagnóstico pré-natal é baseado, primariamente, em exames de ultrassom de fetos no segundo e terceiro trimestre de gestação. Apesar de a maioria dos hospitais e clínicas disporem de ultrassonografia, o exame é feito sem sistematização e, mais frequentemente, para avaliar a biometria fetal. Ademais, existem poucos centros de referência para avaliação avançada.

Alguns dos achados ultrassonográficos de anormalidade podem não ser muito aparentes ou fácil de obter pelo ultrassonografista geral em um exame de rotina. O uso da biometria ao ultrassom para diferenciar fetos com T21 dos fetos normais tem grande atrativo, uma vez que a medição do comprimento umeral é feita de rotina durante o ultrassom obstétrico e não requer treinamento especial, nem equipamento sofisticado⁵⁶. A medida do úmero pode servir como um alerta para que esse feto seja encaminhado

para ser reavaliado por profissional especializado em medicina fetal em centro de referência.

Um grande questionamento é feito em relação à falta de padronização das medidas dos marcadores ultrassonográficos do segundo trimestre e quais os marcadores que realmente deveriam ser utilizados e sua relevância para a detecção de T21. Alguns marcadores são, inclusive, qualitativos, o que torna sua avaliação ainda mais subjetiva^{26,72}.

Mesmo quando o aborto não é uma opção para mulheres de muitos países, inclusive no Brasil, o diagnóstico pré-natal não é sem valor, uma vez que a maior parte das mulheres serão reasseguradas quando os resultados são favoráveis²⁷.

Quando uma malformação é encontrada, os pais têm a oportunidade de ficarem alerta sobre o problema e de se preparar para a situação adversa psicologicamente e financeiramente, além de planejar o parto em um serviço de referência adequado com melhores condições para a mãe e o recém-nascido²⁷.

Estamos conscientes de que vivemos, atualmente, um momento de transição nos métodos de rastreamento ultrassonográfico da T21, especialmente por causa da crescente utilização dos testes não invasivos de altíssima sensibilidade e especificidade, como é o caso da pesquisa de DNA fetal circulante no sangue materno (DFCSM) que muito tem a nos oferecer em diagnóstico pré-natal de cromossomopatias e de outras alterações genéticas do feto⁷.

Com o advento do teste não invasivo, a partir da pesquisa de DFCSM, deverá mudar radicalmente os protocolos de rastreamento de T21 num futuro próximo. A maioria dos marcadores utilizados atualmente para rastreamento de fetos com cromossomopatias servirá, principalmente, para selecionar mulheres para o teste não invasivo. Porém, os custos são altos e a vasta maioria da população estará de fora desse processo, especialmente por não tratar-se de uma política de saúde pública em nosso país a detecção de fetos com cromossomopatias⁷⁸.

Assim, diante do que foi exposto, achamos que cumprimos o objetivo proposto de estudar o valor do marcador úmero no rastreamento da Síndrome de Down fetal baseando-se em dados na nossa população local.

7 CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Nesse estudo há diferença estatisticamente significativa entre o comprimento do úmero de fetos com T21 em relação ao comprimento do úmero de fetos normais, com sensibilidade de 47,2% para o úmero abaixo do 10º percentil, 34,5 % abaixo do 5º percentil e 30,9 % abaixo do percentil 2,5.

O comprimento do úmero abaixo do percentil 10 é 4,4 vezes (RV) mais comum nos fetos com T21 do que nos fetos normais. Já úmero abaixo do percentil 5 é 6,9 vezes (RV) mais comum nos fetos com T21 e abaixo do percentil 2,5 é 12 vezes (RV) mais comum nos fetos com T21 do que nos normais.

A curva de crescimento do úmero de Jeanty, adotada na maioria dos aparelhos de ultrassonografia em todo o mundo, não tem rendimento adequado para uso como controle do crescimento umeral em fetos normais na nossa população, acarretando com seu uso o inevitável aumento da taxa de falsos positivos de úmeros curtos para serem usados como marcador da T21 fetal.

8 ANEXO

ANEXO A – Aprovação do Projeto de Pesquisa.



APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 02/02/2011, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0019/11**, intitulado: "**AValiação DO Comprimento DO Úmero EM Fetos Portadores de Síndrome de Down (T21) Comparado com as Curvas Umerais em Populações Normais.**" apresentado pelo Departamento de **OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA**.

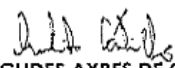
Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Victor Bunduki**

Pesquisador (a) Executante: **Rimena de Melo Germano da Silva**

Co-autores: Eliane Azeka Hase, Javier Miguelez e Marcelo Zugaib.

CAPPesq, 03 de Fevereiro de 2011


PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
 Coordenador
 Comissão de Ética para Análise de
 Projetos de Pesquisa - CAPPesq

9 REFERÊNCIAS

9 REFERÊNCIAS

1. Roizen NJ, Patterson D. Down's syndrome. *Lancet*. 2003; 361(9365): 1281-9.
2. HS C. *Risk estimation in Down's syndrome screening policy and practice*. In: JG Grudzinskas TC MC, H Cuckle., ed. *Screening for Down's syndrome*. Cambridge: Canbridga University Press.; 1994: 31 - 46.
3. Snijders RJ, Sundberg K, Holzgreve W, Henry G, Nicolaides KH. Maternal age- and gestation-specific risk for trisomy 21. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 1999; 13(3): 167-70.
4. Cleves MA, Hobbs CA, Cleves PA, Tilford JM, Bird TM, Robbins JM. Congenital defects among liveborn infants with Down syndrome. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2007; 79(9): 657-63.
5. Tabor A, Alfirevic Z. Update on procedure-related risks for prenatal diagnosis techniques. *Fetal Diagn Ther*. 2010; 27(1): 1-7.
6. Gynecologists ACoOa. ACOG Practice Bulletin No. 88, December 2007. Invasive prenatal testing for aneuploidy. *Obstet Gynecol*. 2007; 110(6): 1459-67.
7. Benn P, Cuckle H, Pergament E. Non-invasive prenatal testing for aneuploidy: current status and future prospects. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2013; 42(1): 15-33.
8. Agopian AJ, Marengo LK, Mitchell LE. Predictors of trisomy 21 in the offspring of older and younger women. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2012; 94(1): 31-5.
9. Benacerraf BR. The history of the second-trimester sonographic markers for detecting fetal Down syndrome, and their current role in obstetric practice. *Prenat Diagn*. 2010; 30(7): 644-52.

10. Vintzileos AM, Egan JF. Adjusting the risk for trisomy 21 on the basis of second-trimester ultrasonography. *Am J Obstet Gynecol.* 1995; 172(3): 837-44.
11. Vintzileos AM, Guzman ER, Smulian JC, McLean DA, Ananth CV. Choice of second-trimester genetic sonogram for detection of trisomy 21. *Obstet Gynecol.* 1997; 90(2): 187-90.
12. Egan JF, Benn P, Borgida AF, Rodis JF, Campbell WA, Vintzileos AM. Efficacy of screening for fetal Down syndrome in the United States from 1974 to 1997. *Obstet Gynecol.* 2000; 96(6): 979-85.
13. Benacerraf BR, Barss VA, Laboda LA. A sonographic sign for the detection in the second trimester of the fetus with Down's syndrome. *Am J Obstet Gynecol.* 1985; 151(8): 1078-9.
14. Benacerraf BR, Gelman R, Frigoletto FD. Sonographic identification of second-trimester fetuses with Down's syndrome. *N Engl J Med.* 1987; 317(22): 1371-6.
15. Benacerraf BR. The second-trimester fetus with Down syndrome: detection using sonographic features. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 1996; 7(2): 147-55.
16. Nyberg DA, Luthy DA, Resta RG, Nyberg BC, Williams MA. Age-adjusted ultrasound risk assessment for fetal Down's syndrome during the second trimester: description of the method and analysis of 142 cases. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 1998; 12(1): 8-14.
17. Nyberg DA, Souter VL, El-Bastawissi A, Young S, Luthardt F, Luthy DA. Isolated sonographic markers for detection of fetal Down syndrome in the second trimester of pregnancy. *J Ultrasound Med.* 2001; 20(10): 1053-63.
18. Nyberg DA, Souter VL. Sonographic markers of fetal trisomies: second trimester. *J Ultrasound Med.* 2001; 20(6): 655-74.
19. Nyberg DA, Souter VL. Use of genetic sonography for adjusting the risk for fetal Down syndrome. *Semin Perinatol.* 2003; 27(2): 130-44.

20. Hansmann M. Trisomy 21 in the mid trimester: sonographic phenotyping of the fetus is the key. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2004; 23(6): 531-4.
21. Bahado-Singh RO, Oz UA, Mendilcioglu I, Mahoney MJ. The mid-trimester genetic sonogram. *Semin Perinatol.* 2005; 29(4): 209-14.
22. Krantz DA, Hallahan TW, Macri VJ, Macri JN. Genetic sonography after first-trimester Down syndrome screening. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2007; 29(6): 666-70.
23. Ben-Ami M, Jadaon JE. [The genetic sonogram]. *Harefuah.* 2009; 148(7): 455-9, 74.
24. Aagaard-Tillery KM, Malone FD, Nyberg DA, et al. Role of second-trimester genetic sonography after Down syndrome screening. *Obstet Gynecol.* 2009; 114(6): 1189-96.
25. Rozenberg P, Bussières L, Chevret S, et al. [Screening for Down syndrome using first-trimester combined screening followed by second trimester ultrasound examination in an unselected population]. *Gynecol Obstet Fertil.* 2007; 35(4): 303-11.
26. Cuckle H, Maymon R. Role of second-trimester ultrasound in screening for Down syndrome. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2013; 41(3): 241-4.
27. Wong AE, Kuppermann M, Creasman JM, Sepulveda W, Vargas JE. Patient and provider attitudes toward screening for Down syndrome in a Latin American country where abortion is illegal. *Int J Gynaecol Obstet.* 2011; 115(3): 235-9.
28. Lockwood C, Benacerraf B, Krinsky A, et al. A sonographic screening method for Down syndrome. *Am J Obstet Gynecol.* 1987; 157(4 Pt 1): 803-8.
29. Vintzileos AM, Campbell WA, Guzman ER, Smulian JC, McLean DA, Ananth CV. Second-trimester ultrasound markers for detection of trisomy 21: which markers are best? *Obstet Gynecol.* 1997; 89(6): 941-4.

30. Smith-Bindman R, Hosmer W, Feldstein VA, Deeks JJ, Goldberg JD. Second-trimester ultrasound to detect fetuses with Down syndrome: a meta-analysis. *JAMA*. 2001; 285(8): 1044-55.
31. Bromley B, Lieberman E, Shipp TD, Benacerraf BR. The genetic sonogram: a method of risk assessment for Down syndrome in the second trimester. *J Ultrasound Med*. 2002; 21(10): 1087-96; quiz 97-8.
32. Bottalico JN, Chen X, Tartaglia M, Rosario B, Yarabothu D, Nelson L. Second-trimester genetic sonogram for detection of fetal chromosomal abnormalities in a community-based antenatal testing unit. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2009; 33(2): 161-8.
33. Hobbins JC, Lezotte DC, Persutte WH, et al. An 8-center study to evaluate the utility of mid-term genetic sonograms among high-risk pregnancies. *J Ultrasound Med*. 2003; 22(1): 33-8.
34. Cicero S, Sacchini C, Rembouskos G, Nicolaidis KH. Sonographic markers of fetal aneuploidy - a review. *Placenta*. 2003; 24(Suppl B): S88-98.
35. Bethune M. Literature review and suggested protocol for managing ultrasound soft markers for Down syndrome: thickened nuchal fold, echogenic bowel, shortened femur, shortened humerus, pyelectasis and absent or hypoplastic nasal bone. *Australas Radiol*. 2007; 51(3): 218-25.
36. Bahado-Singh RO, Oz U, Hsu CD, Deren O, Copel JA, Mahoney MJ. Ratio of nuchal thickness to humerus length for Down syndrome detection. *Am J Obstet Gynecol*. 2001; 184(6): 1284-8.
37. Rodis JF, Vintzileos AM, Fleming AD, et al. Comparison of humerus length with femur length in fetuses with Down syndrome. *Am J Obstet Gynecol*. 1991; 165(4 Pt 1): 1051-6.
38. Szigeti Z, Csaba A, Pete B, Hajdú J, Papp Z, Papp C. Correlation of prenatal sonographic diagnosis and morphologic findings of fetal autopsy in fetuses with trisomy 21. *J Ultrasound Med*. 2007; 26(1): 61-8; quiz 9-70.

39. Peters MT, Lockwood CJ, Miller WA. The efficacy of fetal sonographic biometry in Down syndrome screening. *Am J Obstet Gynecol.* 1989; 161(2): 297-300.
40. Nyberg DA, Resta RG, Luthy DA, Hickok DE, Williams MA. Humerus and femur length shortening in the detection of Down's syndrome. *Am J Obstet Gynecol.* 1993; 168(2): 534-8.
41. Johnson MP, Michaelson JE, Barr M, et al. Combining humerus and femur length for improved ultrasonographic identification of pregnancies at increased risk for trisomy 21. *Am J Obstet Gynecol.* 1995; 172(4 Pt 1): 1229-35.
42. Gray DL, Dicke JM, Dickerson R, McCourt C, Odibo AO. Reevaluating humeral length for the detection of fetal trisomy 21. *J Ultrasound Med.* 2009; 28(10): 1325-30.
43. Vergani P, Locatelli A, Ghidini A, et al. Caveats for the use of humerus length in the prediction of fetal Down syndrome. *Fetal Diagn Ther.* 2003; 18(3): 190-5.
44. BR K. Essential medical statistics. 2nd ed. <st1:state w:st="on">Massachusetts, <st1:place w:st="on"><st1:country-region w:st="on">USA</st1:country-region>: Blackwell Science; 2006.
45. Zelop CM, Borgida AF, Egan JF. Variation of fetal humeral length in second-trimester fetuses according to race and ethnicity. *J Ultrasound Med.* 2003; 22(7): 691-3.
46. Ogasawara KK. Variation in fetal ultrasound biometry based on differences in fetal ethnicity. *Am J Obstet Gynecol.* 2009; 200(6): 676.e1-4.
47. Miguelez J. *Relação entre a medida da translucência nugal no primeiro trimestre e a presença de marcadores ultrassonográficos para a Síndrome de Down no segundo trimestre de gestação*: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2011.
48. Adams MM, Erickson JD, Layde PM, Oakley GP. Down's syndrome. Recent trends in the United States. *JAMA.* 1981; 246(7): 758-60.

49. DeVore GR, Romero R. Genetic sonography: an option for women of advanced maternal age with negative triple-marker maternal serum screening results. *J Ultrasound Med.* 2003; 22(11): 1191-9.
50. DeVore GR, Romero R. Genetic sonography: a cost-effective method for evaluating women 35 years and older who decline genetic amniocentesis. *J Ultrasound Med.* 2002; 21(1): 5-13.
51. Dicke JM, Gray DL, Songster GS, Crane JP. Fetal biometry as a screening tool for the detection of chromosomally abnormal pregnancies. *Obstet Gynecol.* 1989; 74(5): 726-9.
52. Benacerraf BR, Neuberger D, Frigoletto FD. Humeral shortening in second-trimester fetuses with Down syndrome. *Obstet Gynecol.* 1991; 77(2): 223-7.
53. Vintzileos AM, Egan JF, Smulian JC, Campbell WA, Guzman ER, Rodis JF. Adjusting the risk for trisomy 21 by a simple ultrasound method using fetal long-bone biometry. *Obstet Gynecol.* 1996; 87(6): 953-8.
54. FitzSimmons J, Droste S, Shepard TH, Pascoe-Mason J, Chinn A, Mack LA. Long-bone growth in fetuses with Down syndrome. *Am J Obstet Gynecol.* 1989; 161(5): 1174-7.
55. Johnson MP, Michaelson JE, Barr M, et al. Sonographic screening for trisomy 21: fetal humerus:foot length ratio, a useful new marker. *Fetal Diagn Ther.* 1994; 9(2): 130-8.
56. Tannirandorn Y, Manotaya S, Uerpairojkit B, Tanawattanacharoen S, Wacharaprechanont T, Charoenvidhya D. Value of humerus length shortening for prenatal detection of Down syndrome in a Thai population. *J Obstet Gynaecol Res.* 2002; 28(2): 89-94.
57. Agathokleous M, Chaveeva P, Poon LC, Kosinski P, Nicolaides KH. Meta-analysis of second-trimester markers for trisomy 21. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2013; 41(3): 247-61.

58. Tahmasebpour AR, Pirjani R, Rahimi-Foroushani A, Ghaffari SR, Rahimi-Sharbat F, Masrour FF. Normal ranges for fetal femur and humerus diaphysis length during the second trimester in an Iranian population. *J Ultrasound Med.* 2012; 31(7): 991-5.
59. Mastrobattista JM, Pschirrer ER, Hamrick MA, et al. Humerus length evaluation in different ethnic groups. *J Ultrasound Med.* 2004; 23(2): 227-31.
60. Sood M, Rochelson B, Krantz D, et al. Are second-trimester minor sonographic markers for Down syndrome useful in patients who have undergone first-trimester combined screening? *Am J Obstet Gynecol.* 2010; 203(4): 408.e1-4.
61. Wax JR, Pinette MG, Cartin A, Blackstone J. Second-trimester genetic sonography after first-trimester combined screening for trisomy 21. *J Ultrasound Med.* 2009; 28(3): 321-5.
62. Jeanty P, Kirkpatrick C, Dramaix-Wilmet M, Struyven J. Ultrasonic evaluation of fetal limb growth. *Radiology.* 1981; 140(1): 165-8.
63. Jeanty P, Dramaix-Wilmet M, van Kerkem J, Petroons P, Schwes J. Ultrasonic evaluation of fetal limb growth: part II. *Radiology.* 1982; 143(3): 751-4.
64. Exacoustos C, Rosati P, Rizzo G, Arduini D. Ultrasound measurements of fetal limb bones. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 1991; 1(5): 325-30.
65. J N, MH K, CJ N, W W. *Applied linear statistical models.* 4th ed. Illinois, USA: Richard D. Irwing; 1996.
66. Bindra R, Heath V, Liao A, Spencer K, Nicolaides KH. One-stop clinic for assessment of risk for trisomy 21 at 11-14 weeks: a prospective study of 15 030 pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2002; 20(3): 219-25.
67. Nicolaides KH. First-trimester screening for chromosomal abnormalities. *Semin Perinatol.* 2005; 29(4): 190-4.

68. Nicolaides KH, Wegrzyn P. [Sonographic features of chromosomal defects at 11(+0) to 13(+6) weeks of gestation]. *Ginekol Pol.* 2005; 76(6): 423-30.
69. HS C, PA B. Multi-marker maternal serum screening for chromosomal abnormalities. In: Milunsky AMaJM, ed. *Genetic disorders and the fetus*. 6th ed. Oxford, UK: Wiley-Blackwell; 2010.
70. Spencer K. Aneuploidy screening in the first trimester. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2007; 145C(1): 18-32.
71. Nicolaides KH. Screening for fetal aneuploidies at 11 to 13 weeks. *Prenat Diagn.* 2011; 31(1): 7-15.
72. CY C, FS P, FK L. The mid-trimester genetic ultrasound: past, present and future. *J Med Ultrasound.* 2009; 17(3): 143-56.
73. Cuckle HS, Malone FD, Wright D, et al. Contingent screening for Down syndrome--results from the FaSTER trial. *Prenat Diagn.* 2008; 28(2): 89-94.
74. Nicolaides KH, Wegrzyn P. [Sonographic features of chromosomal defects in the second trimester of pregnancy]. *Ginekol Pol.* 2005; 76(7): 528-35.
75. Nicolaides KH. Screening for chromosomal defects. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2003; 21(4): 313-21.
76. Van den Hof MC, Wilson RD, Diagnostic Imaging Committee ScoOaGoC, Genetics Committee ScoOaGoC. Fetal soft markers in obstetric ultrasound. *J Obstet Gynaecol Can.* 2005; 27(6): 592-636.
77. Cuckle H. Suboptimal Down syndrome screening test interpretation. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2006; 27(1): 6-8.
78. Ventura W, Nazario-Redondo C, Sekizawa A. Non-invasive prenatal diagnosis from the perspective of a low-resource country. *Int J Gynaecol Obstet.* 2013; 122(3): 270-3.